

Aus der Frauenklinik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Buchholz

**UNTERSUCHUNGEN ZUR STEROIDSULFATIERUNG IM
MENSCHLICHEN OVAR UNTER IN VITRO BEDINGUNGEN**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von —

BERNHARD GROSCH
—
aus Petersberg

Marburg/Lahn 1975
—

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus der Frauenklinik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Buchholz

UNTERSUCHUNGEN ZUR STERIODSULFATIERUNG IM
MENSCHLICHEN OVAR UNTER IN VITRO BEDINGUNGEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

BERNHARD GROSCH
aus Petersberg

Marburg/Lahn 1975

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am: 22.8.1975
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof.Dr. H. Oepen

Referent: Prof.Dr. G. Sturm

Correferent: Prof.Dr. E. Daume

Meinen Eltern

gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1 Abkürzungen und Trivialnamen	5
2.2 Verwendete Lösungsmittel	5
2.3 Verwendete Chemikalien, Radiochemikalien, Vergleichssubstanzen, Scintillationsflüssigkeit, Enzympräparate	6 6 7
2.4 Ovarperfundate	7
2.5 Isolierung der Steroidkonjugate	8
2.5.1 Extraktion der freien Steroide aus dem Ovarperfundat	8
2.5.2 Extraktion der Konjugate aus dem Ovarperfundat	8
2.6 Identifizierung der Steroidkonjugate	11
2.6.1 Dünnschichtchromatographie der Steroidkonjugate	11
2.6.2 Chromatographie der durch Spaltung freigesetzten, freien Steroide	11
2.6.3 Chromatographie der Steroidderivate nach Acetylierung	12
2.6.4 Elution der aufgetrennten Substanzen aus den DC-Platten	12
2.7. Vergleichssubstanzen und deren Nachweis	13
2.8 Nachweis radioaktiver Steroide: Autoradiographie, Dünnschichtscanner, Scintillationszähler	13
2.9. Spaltung der Steroidkonjugate	14
2.9.1 Enzymatische Spaltung der Konjugate	14
2.9.2 Saure Hydrolyse der Konjugate	14
2.10. Derivatbildung der freien Steroide: Acetylierung, Methylierung	15
3.1 Ergebnisse	17
3.2 Tabellen und Abbildungen	18

4.	Diskussion	25
5.	Zusammenfassung	30
6.	Literaturangaben	32
7.	Lebenslauf	43
8.	Akademische Lehrer	44

1. EINLEITUNG

Seit langem ist bekannt, daß organische Substanzen unter anderem als Schwefelsäureester im Urin von Säugetieren ausgeschieden werden. Man sah in der Bildung von Sulfatestern in der Leber lediglich einen Mechanismus des Körpers, die Löslichkeit von schädlichen Fremdstoffen und auch natürlich vorkommenden Verbindungen zu erhöhen, um sie über die Niere zur Ausscheidung zu bringen (67). Im Jahre 1938 gelang es SCHACHTER und MARRIAN (51), aus dem Urin von trächtigen Stuten erstmals ein Steroidsulfat, das Östronsulfat, zu isolieren. Als alleiniger Bildungsort für Steroidsulfate erkannte man anfangs ausschließlich die Leber. In Präparationen dieses Organs konnten auch die zur Biosynthese von Steroidsulfaten benötigten Enzymgruppen gefunden werden (46,66,48).

Eine Berichtigung dieser Ansicht wurde durch den Nachweis erforderlich, daß Androstendionsulfat auch in vitro von menschlichem Nebennierengewebe synthetisiert werden kann (51,16,23,6). BAULIEU fand im Jahre 1962 im venösen Blut der Nebenniere eine höhere Konzentration von Androstendionsulfat als im peripheren Blut und vermutete, daß Steroidsulfate auch Produkte von anderen endokrinen Geweben sein können. (6) Inzwischen wurden Steroidsulfate in Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Galle und Fruchtwasser, in Organen wie Leber, Niere, Gehirn, in Tumoren der Mamma und Nebenniere und auch in endokrinen Organen mit der Fähigkeit zur Steroidsynthese nachgewiesen (19, 51, 13, 59, 44, 23, 40, 65, 20, 9, 21, 36, 52, 58, 60, 3, 16, 30, 53, 61, 4, 5, 11, 62, 18, 24, 26, 41, Übersicht z.B. von Wang und Bulbrook, 1968 (64).

Im Testesgewebe wurden Steroidsulfate und freie Steroide in ungefähr gleich hoher Konzentration beobachtet (RUOKONEN et al. 1972 (49) und auch der Nachweis einer hohen Steroidsulfatsekretion geführt (LAATIKAINEN et al. 1969 (28), 1971 (29)).

Für das Rinderovar wurde 1965 von PAYNE und MASON (41) an löslichen Enzympräparationen die Möglichkeit der Steroidsulfatierung aufgezeigt. Sie fanden, daß angebotenes 4-¹⁴C-Östradiol ($30 \mu\text{C/mg}$; $0.055 \mu\text{Mol/l}$, $5 \text{ mg Protein} = 0.047 \mu\text{C/mg Protein}$) zu 1,87 % in die Östron-Sulfat und Östradiol-3-Sulfat umgewandelt wurde. Zusätzlich wurden noch in geringen Mengen zwei nicht identifizierte, hoch polare Derivate von Östradiol-17 β , möglicherweise Glucuronide, nachgewiesen. Eine Sulfatierung in 17 β -Stellung des Östradiols, welches z.B. mit Rattenleberextrakten erzielt wird, konnte hier nicht gefunden werden. Von den Autoren wurde dieser Befund auf Organ- oder Speziesunterschiede in der Verteilung spezifischer Sulfotransferasen zurückgeführt. HOLCENBERG und ROSEN (24) untersuchten 1965 ebenfalls die enzymatische Sulfatierung von Steroiden in Präparationen aus Rindergeweben. Markiertes Östron, Dehydroepiandrosteron, Testosteron und p-Nitrophenol wurden als Substrate angeboten. Im Gegensatz zu Organen wie Leber, Plazenta und Nebenniere, von denen diese Substrate in erheblichem Umfang sulfatiert worden waren, konnten in Ovarien nur ganz geringe Mengen von Östrogensulfaten gefunden werden. In menschlichen Ovarien war diese Sulfatierung noch geringer als in Rinderovarien und mit den angewandten Methoden (Papierchromatographie) eben noch nachweisbar. Eine bereits vielfach bewährte Methode zur Stoffwechseluntersuchung verschiedener Steroide stellt die in vivo oder in vitro

Perfusion eines zu untersuchenden Organs dar. Hierbei läßt sich der Stoffwechsel eines angebotenen, gegebenenfalls radioaktiv markierten Steroids ohne Zellzerstörung und unter annähernd physiologischen Versuchsbedingungen untersuchen. Über derartige Experimente am Ovar hatten schon AAKVAAG und EIK-NES, 1965 (1), NAKAYAMA et al., 1967 (37) und ENGELS et al. 1968 (22) berichtet.

Beim Schaf zeigten 1970 (45) RADO et al. an autotransplantierten Ovarien, daß Testosteron und Androstendion zu Östradiol-17 β und Östron aromatisiert werden. Östradiol-17 β , Östriol oder die hier speziell interessierenden Östrogenkonjugate konnten dagegen trotz spezifischer Aufarbeitungen nicht nachgewiesen werden.

Für den Menschen konnte 1964 von WALLACE und SILBERMAN (62) in vitro gezeigt werden, daß Gewebsstücke und Homogenate von normalen menschlichen Ovarien die angebotenen Steroide Androstenediol und Δ^5 -Androsten-3 β -17 β -diol mit einer Ausbeute unter 1% sulfatieren können. Die Identifizierung dieser Steroidsulfate gelang mit Hilfe der Säulen- und Papierchromatographie, durch Kristallisation zur konstanten spezifischen Aktivität und durch Solvolyse in Tetrahydrofuran und Derivatbildung (Acetylierung). In ähnlichen Versuchen konnten 1973 E. MELVILLE und H. BRAUNSBURG (35) eine geringe Sulfatierung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Östradiol in Gewebsstücken menschlicher Ovarien nachweisen. Aryl- und Steroidsulfatasen im menschlichen Ovar konnten ebenfalls gefunden werden (50).

AAKVAAG und FYLLING fanden 1968 (2) im Ovarialvenenblut von drei Frauen eine höhere Konzentration von Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S) als im peripheren Blut und schlossen daraus, daß

DHEA-S aus dem menschlichen Ovar sezerniert wird.

Die untersuchten Blutproben stammten jedoch von einer Patientin mit Stein-Leventhal-Syndrom, einer anderen mit Endometriose, während die dritte Patientin vorher mit FSH behandelt worden war.

KALLIALA et al. bestimmten 1970 (25) die Konzentrationen von verschiedenen Steroiden im menschlichen Ovarialvenenblut und verglichen diese Werte mit den entsprechenden Konzentrationen im peripheren Blutplasma bei sechs Patientinnen mit normalen Ovarien. Während sie hierbei bei der Progesteronbestimmung deutliche Unterschiede in den Konzentrationen als Ausdruck der Exaktheit ihrer Versuchsanordnung nachweisen konnten, fanden sie die Konzentrationen der Steroidsulfate im Ovarialvenenblut und im peripheren Blut gleich hoch. Die Autoren folgerten aus ihren Experimenten, die sowohl mit Ovarien der Follikel- als auch der Corpus luteum Phase durchgeführt wurden, daß normale menschliche Ovarien keine Steroidsulfate sezernieren. Gleichzeitig schlossen sie durch ihre Messungen eine mögliche Speicherung von Konjugaten im Ovar aus. Diesen letzteren Befunden entgegenstehend, wurden jedoch bei Untersuchungen von STURM und STÄHLER zum Steroidstoffwechsel in isoliert perfundierten menschlichen Ovarien (55) sehr stark polare Metabolite der angebotenen Precursoren nachgewiesen, deren Eigenschaften auf das Vorhandensein von Steroidsulfaten in den Ovarperfundaten schließen ließen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, solche Konjugate aus den Ovarperfundaten zu isolieren und den Nachweis ihrer Identität als Steroidsulfate oder Steroidglucuronide zu führen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Abkürzungen und Trivialnamen

Folgende Abkürzungen finden Verwendung:

DC	: Dünnschichtchromatographie
EtOH	: Äthanol
Et ₂ O	: Äther
EtOAc	: Essigsäureäthylester

Folgende Trivialnamen finden Verwendung:

Androsteron:	3- α -Hydroxy-5-androstan-17-on
Dehydroepiandrosteron (DHEA):	3 β -Hydroxy-androst-5-en-17-on
Östron:	3-Hydroxy-östra-1,3,5(10)-trien-17-on
Östradiol:	Östra-1,3,5,(10)-trien-3, 17 β -diol
Östriol:	Östra-1,3,5 (10)-trien-3,16,17 β -triol
Pregnenolon:	3 β -Hydroxy-pregn-5-en-20-on
Testosteron:	17 β -Hydroxy-androst-4-en-3-on.

2.2. Verwendete Lösungsmittel

Verwendet wurden p.a. Lösungsmittel der Fa. Merck, Darmstadt, welche zum Teil vor Gebrauch redestilliert wurden:

Acetanhydrid Art. 42, Aceton Art. 14, Äthanol Art. 972, Diäthyl-Äther Art. 921, Chloroform Art. 2445, Essigsäure Art. 90063, Essigsäureäthylester Art. 9623, konz. HCl Art 317, konz. H₂SO₄ Art. 731, Methanol Art. 6009, 1n NaOH Art. 9137, Pyridin Art. 9728, Toluol Art. 8325.

2.3. Verwendete Chemikalien

Verwendet wurden Chemikalien der Fa. Merck, Darmstadt:

NaHCO_3 Art.: 6329, Na_2SO_4 Art.: 6649.

Radiochemikalien

Als Precursor diente 4- ^{14}C -Testosteron mit einer spezifischen Aktivität von 57,5 mCi/mMol (Fa. Amersham-Buchler, Hannover), das in einer Konzentration von 0,7 $\mu\text{Ci/ml}$ Perfusionsmedium eingesetzt wurde. Das Präparat wurde vor Verwendung dünn-schichtchromatographisch auf seine Reinheit und Einheitlichkeit geprüft.

Vergleichssubstanzen

Testosteron, Östradiol, Östron, Östriol, Androstendion wurden von der Fa. E. Merck, Darmstadt gekauft;

Testosteron-Glucuronid, Östradiol-Sulfat, Östron-Sulfat und Dehydroepiandrosteron-Sulfat und Pregnenolon-Sulfat wurden von Ikapharm, Ramet-Gan, Israel, erworben;

Testosteronsulfat, Testosteronacetat, Östradioldiacetat, Östronacetat wurden nach den später beschriebenen Verfahren hergestellt.

Scintillationsflüssigkeit

Insta-Gel, Fa. Packard, Frankfurt

Enzympräparate

a) Helix pomatia Extrakt

Suc D'Helix Pomatia (100.000 U β -Glucuronidase (Fishman),
800.000 U Sulfatase (Roy)), Industrie biologique francaise,
35 Quai du Moulin de Cage-92-Gennevilliers.

b) Steroidsulfatase (Schering, Berlin)

2.4 Ovarperfundate

Zur Untersuchung der Fragestellung dieser Arbeit dienten
mehrere 2-Stunden-Perfundate eines menschlichen Ovars. Die
Perfusionsmethode ist bei STÄHLER et al. (54) ausführlich
beschrieben:

Die Ovarien wurden von Patientinnen erhalten, die an Cervix-
Carcinom erkrankt waren. Nach einer warmen Ischämie von weni-
gen Sekunden und einer kalten Ischämie von weniger als 12 min.
nach erfolgter Exstirpation, während der das Ovar von der A.ovari-
ca kanüliert und an das Perfusionssystem angeschlossen wurde,
erreichte das Organ binnen 20 Minuten wieder seine volle Vita-
lität. Perfundiert wurde mit einem synthetischen, hämoglobin-
freien Medium (100 ml) in einem rezirkulierenden System bei
36,5°C und einem konstanten Durchfluß von 1,2 ml/min/g Ovar
über Perioden von jeweils zwei Stunden. Die intakte Funktion
des Ovars wurde während des gesamten Experimentes ständig über-
wacht, und zwar durch kontinuierliche Aufzeichnung des pH-Wertes
des Perfusionsmediums, des Sauerstoffverbrauches des Ovars und
des arteriellen Druckes. Biochemische Parameter wie Glucose-Ver-

brauch und Lactat/Pyruvat Quotient wurden zusätzlich bestimmt. In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die hier eingesetzte Perfusionsmethode das Ovar in einem weitgehend physiologischen Stoffwechselzustand erhält, der als Voraussetzung für einen ungestörten Steroidstoffwechsel zu gelten hat.

Das Ovar einer 46-jährigen Patientin wurde in 5 Intervallen zu je 2 Stunden mit jeweils 100 ml eines synthetischen, hämoglobinfreien Perfusionsmedium rezirkulierend durchströmt.

¹⁴C-Testosteron mit einer spezifischen Aktivität von 57,5 mCi/mMol war in einer Konzentration von 0,7 µCi/ml ($\hat{=}$ 0,37 mg/100 ml Perfundat) dem Perfusionsmedium zugesetzt. Bis zur ihrer Aufarbeitung waren die Ovarperfundate bei -20°C eingefroren.

2.5 Isolierung der Steroidkonjugate

2.5.1 Extraktion der freien Steroide aus dem Ovarperfundat

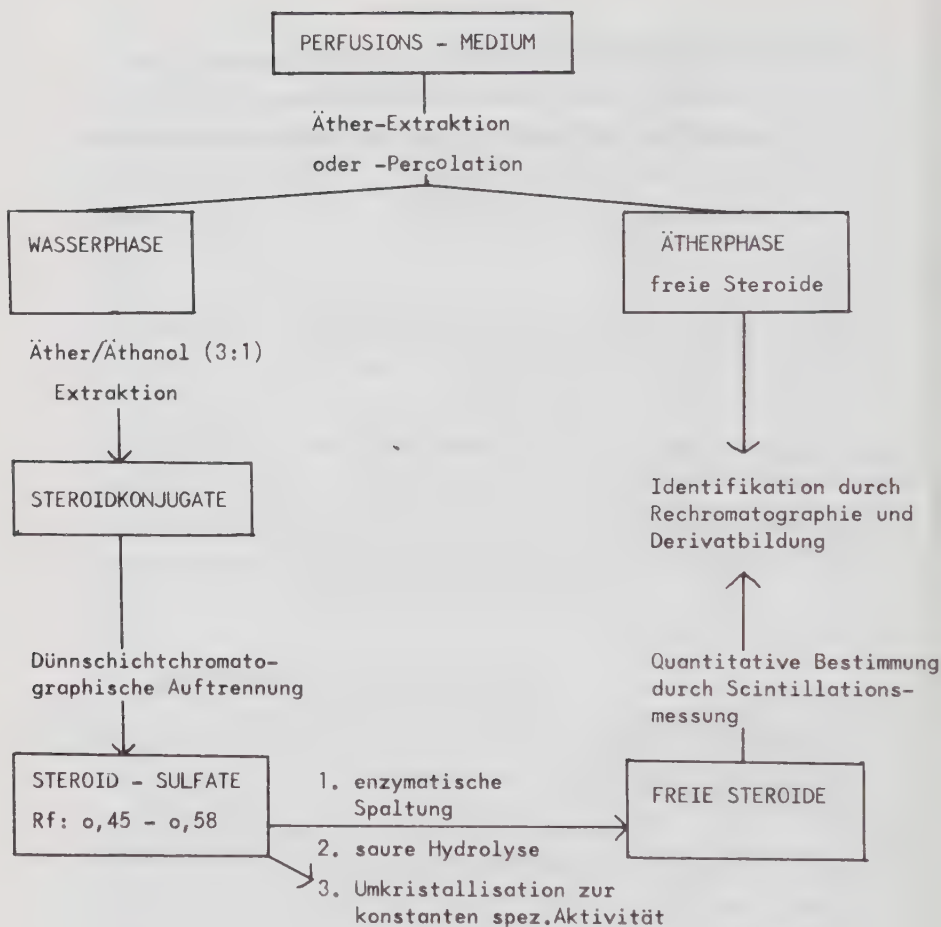
Nach Auftauen der Perfundate konnten nach Sättigung mit NaCl durch zweistündige Percolation mit 100 ml Et₂O- oder bei einer anderen Aufarbeitung, durch erschöpfende Extraktion mit gleichen Volumina Et₂O im Scheidetrichter (8 mal)-, die freien Steroide in der Et₂O-Phase angereichert und durch Trennung der beiden Phasen aus dem Perfundat gewonnen werden.

2.5.2 Extraktion der Konjugate aus dem Ovarperfundat

Zur Gewinnung der Steroidkonjugate wurde die nach Extraktion der freien Steroide verbleibende wässrige Phase vier mal mit gleichen Volumina Et₂O/EtOH (V/V 3:1) im Scheidetrichter extrahiert. Durch Zugabe von Na₂SO₄ konnte die nach dem Filtrieren

gewonnene $\text{Et}_2\text{O}/\text{EtOH}$ -Phase wasserfrei erhalten werden.

Der Arbeitsgang zur Isolierung und Identifizierung speziell der Steroidsulfate ist in Abbildung 1 vereinfacht dargestellt:



DC: Laufmittel 131: Äthylacetat : Pyridin : H₂O : Acetessigsäure
(62:21:11:6)

Laufmittel 1 : Benzol : Äthylacetat, 1:1 (2x entwickelt)

Laufmittel 2 : CHCl₃ : Äthylacetat, 4:1 (3x entwickelt)

Laufmittel 3 : Cyclohexan : Äthylacetat, 1:1

Laufmittel 4 : CHCl₃ : Aceton, 95:5

2.6 Identifizierung der Steroidkonjugate

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf 20x20 cm Kieselgel-Platten 60 F, 254, der Fa. Merck (Darmstadt) mit einer Schichtdicke von 0,25 mm bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.6.1 Chromatographie der Steroidkonjugate

Wie aus Vorversuchen hervorging, war das hier verwendete Laufmittel 131 (R. NEHER und E. von ARX) am besten zur Trennung von Steroidsulfaten und Steroidglucuroniden geeignet;

Laufmittel 131: EtOAc/Pyridin/Essigsäure/H₂O
(Vol. 62:21:6:11)

Laufstrecke: 14 cm

Laufzeit: 3 h

2.6.2 Chromatographie der unkonjugierten Steroide

Die chromatographische Auftrennung der freien Steroide - und auch der durch Spaltung der Steroidkonjugate erhaltenen freien Steroide - wurde durch eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (siehe Abb.1) erreicht (32). Dazu wurden die Substanzen in einem Punkt, der 2,5 cm von den Kanten der DC-Platte entfernt war, aufgetragen.

Laufmittel 1: Benzol/EtOAc (5o:5o)

In diesem Laufmittel 1 wurde die DC-Platte
2x bis zur Höhe von 18 cm entwickelt.

Laufmittel 2: Chloroform/EtOAc (8o:2o)

Anschließend wurde die Platte nach Drehung
um 9o^o 3x im Laufmittel 2 bis zu einer Höhe
von 18 cm entwickelt.

2.6.3 Eindimensionale Chromatographie der Steroidderivate
nach Acetylierung

Die durch die Acetylierung von Steroiden erhaltenen Derivate
wurden zusätzlich in folgenden Laufmitteln dünn-schichtchroma-
tographisch aufgetrennt:

Laufmittel 3: Cyclohexan/EtOAc (5o:5o)

Laufmittel 4: Chloroform/Aceton (95:5)

2.6.4 Elution der aufgetrennten Substanzen aus den DC-Platten

Die durch DC aufgetrennten freien Steroide oder Steroidkon-
jugate wurden nach Auskratzen der jeweiligen Zonen auf der
DC-Platte quantitativ mit Methanol aus dem Kieselgel eluiert.
Nach Abdampfen des Methanols am Rotationsverdampfer bei Tempe-
raturen nicht über 4o^oC, konnten die Substanzen zur Weiterver-
arbeitung in einem anderen Lösungsmittel aufgenommen werden.

2.7 Vergleichssubstanzen und deren Nachweis

Bei allen durchgeführten chromatographischen Trennungen wurden nicht-radioaktive Vergleichssubstanzen zur Charakterisierung der gesuchten Substanzen mitchromatographiert. Diese Substanzen wurden sichtbar gemacht:

1. durch Fluoreszenz-Nachweis unter ultraviolettem Licht, (Mineralight UVS[®]12, 360 nm),
2. bei nicht-fluoreszierenden Substanzen durch Ansprühen mit H₂SO₄/Methanol (1:1) und anschließendem Erhitzen auf 120°C.

2.8 Nachweis radioaktiver Steroide

Autoradiographie

Die auf den DC-Platten aufgetrennten, radioaktiven Substanzen konnten mit Hilfe der Autoradiographie nachgewiesen werden. Dazu mußte der Röntgenfilm (Agfa) direkt auf der Kieselgelschicht fixiert werden. Die Belichtungsdauer der Röntgenfilme richtete sich nach der jeweils aufgetragenen Menge an radioaktiver Substanz und dauerte 1 - 3 Wochen. Die Radioaktivität führte hierbei zur Schwärzung des Röntgenfilmes und ermöglicht so durch Bezug auf Markierungspunkte eine genaue Lokalisierung der radioaktiven Metabolite.

DC-Scanner

Zum gleichen Zweck wurde bei einem Teil der Untersuchungen der schneller arbeitende Dünnschicht-Scanner (Modell II - LB 2723 von Berthold, Wildbad) eingesetzt.

Scintillationszähler

Die mit obigen Verfahren lokalisierten Substanzen konnten aus dem Kieselgel quantitativ mit Methanol eluiert werden. Aliquote Proben des Eluats wurden in Scintillationsflüssigkeit aufgenommen und in einem Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen (Liquid Scintillation System, Beckman, LS-250). Als Scintillationsflüssigkeit wurden jeweils 10 ml Insta-Gel (Packard) verwendet.

2.9 Spaltung der Konjugate

2.9.1 Enzymatische Spaltung der Konjugate

Die durch Abdampfen der jeweiligen Lösungsmittel erhaltenen Konjugate wurden in 4 ml Acetat-Puffer (pH 4,6; 0,1 molar) aufgenommen. Durch Zugabe von 0,1nNaOH wurde ein pH von 4,8 eingestellt und 1,5 ml Helix pomatia Extrakt (=15.000 IU) und ebenfalls 2 mg Steroidsulfatase (Schering) hinzugefügt. Das Gemisch wurde 72 h im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Die durch die Enzyme freigesetzten Steroide wurden dann aus dem durch Zentrifugieren erhaltenen Überstand mit Äther vollständig extrahiert.

2.9.2 Saure Hydrolyse der Steroidkonjugate

Ein anderer Teil der zur Trockne gebrachten Konjugate wurde in 3 ml H₂O gelöst, 0,5 ml konzentrierte HCl und 6 ml Toluol wurden hinzugegeben. Das Gemisch wurde 45 min unter Rückfluß zum Sieden gebracht. Die durch H⁺-Ionen freigesetzten, also nicht mehr konjugierten Steroide werden hierbei im Moment

ihrer Freisetzung in der Toluolphase gelöst und so dem weiteren Einfluß der H^+ -Ionen entzogen. Die Toluolphase wurde dann im Scheidetrichter von der wässrigen Phase abgetrennt, mit $NaHCO_3$ neutral gewaschen und nach Trocknung mit Na_2SO_4 am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht.

2.1o Derivatbildung der freien Steroide

Acetylierung der freien Steroide

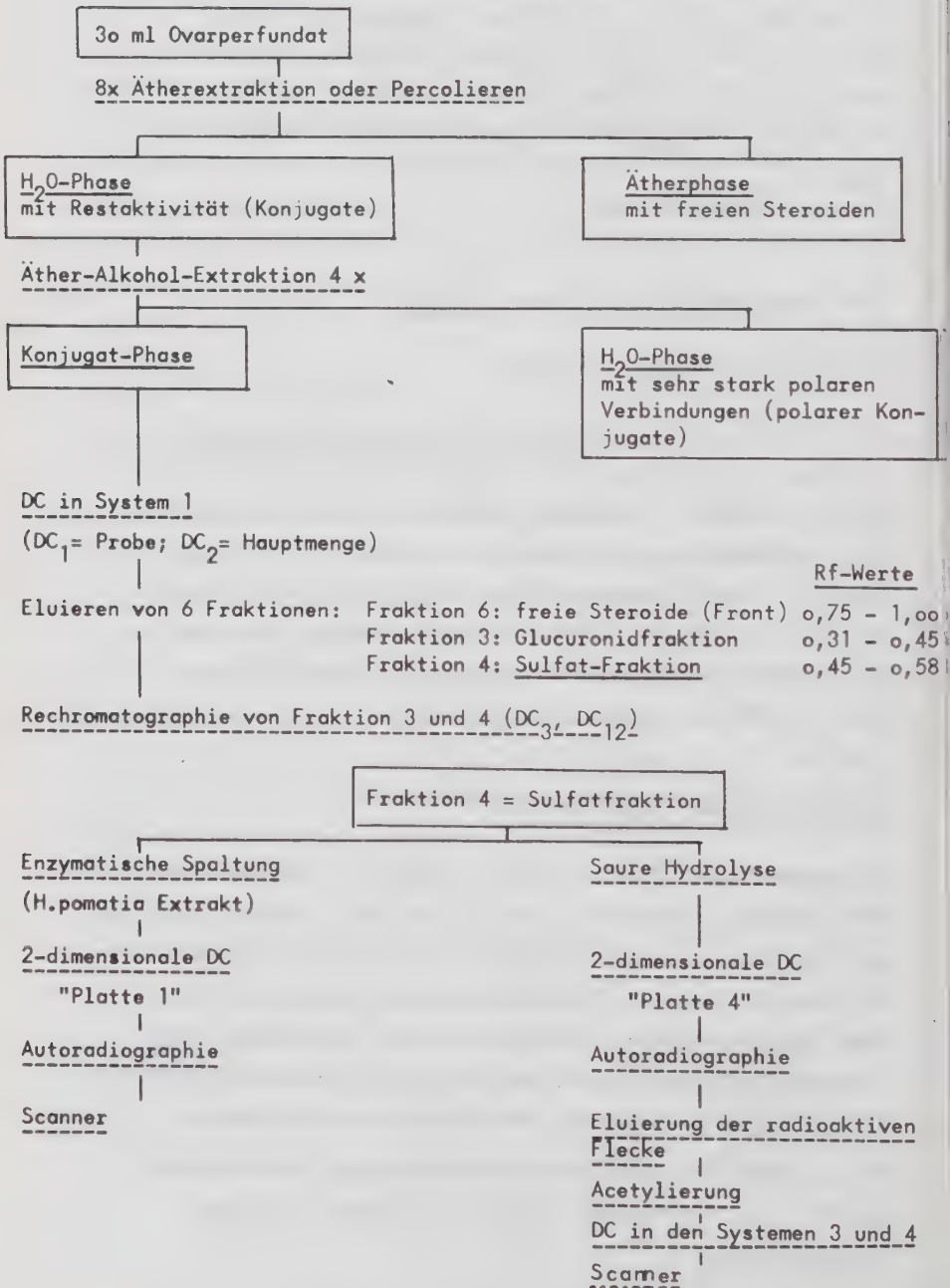
Die zur Acetylierung vorgesehenen Steroidproben wurden in einem Gemisch von 0,1 ml Acetanhydrid und 0,1 ml Pyridin gelöst. Nach 6 - 12 stündiger Reaktion bei Raumtemperatur wurde der Überschuß an Reagenzien im Vakuum bei $60^\circ C$ abgedampft. Um die Reagenzien restlos zu entfernen, wurde der Rückstand noch zweimal in Benzol aufgenommen und erneut zur Trockne gebracht. Der danach in Et_2O gelöste Rückstand wurde zur Chromatographie weiterverwendet.

Methylierung der freien Steroide

Diazomethan wurde nach de BOER und BACKER (17) aus Nitroso-methyl-toluol-sulfamid gewonnen. Die zu methylierenden Substanzen wurden in Äther gelöst und mit ätherischer Diazomethanlösung im Überschuß versetzt. Die Reaktionsmischung wurde im Dunkeln über 24 h bei Raumtemperatur gehalten und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Die so gebildeten Methyl-äther der Östrogene dienten den weiteren Untersuchungen.

Die einzelnen Schritte bei der Identifizierung der Steroidsulfate sind in folgendem Aufarbeitungsschema detailliert zusammengefaßt:

AUFARBEITUNGS-SCHEMA



3. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Zweck der Isolierung von Steroidsulfaten Perfundate eines menschlichen Ovars eingesetzt. Von insgesamt fünf 2-Stunden-Perfundaten (jeweils 100 ml) wurde ein Aliquot von 30 ml des ersten Ovarperfundates untersucht. Die darin vorhandenen radioaktiven, freien Steroide (16 Millionen dpm = angebotenes ^{14}C -Testosteron und seine Metabolite) wurden durch achtmalige Extraktion oder durch Percolieren mit Äther nahezu vollständig aus dem Perfundat extrahiert.

Es verblieb eine Restaktivität von 252.000 dpm in der so extrahierten Wasserphase, entsprechend 1,49 % der ursprünglich enthaltenen Aktivität.

Der größte Teil, etwa 80 % dieser polaren, radioaktiven Metabolite konnte anschließend durch viermalige Et_2O EtOH (v/v 3:1) Extraktion aus der Wasserphase isoliert werden (= Konjugatphase). Die nach diesen Extraktionen noch verbliebene Restaktivität in der Wasserphase ließ sich auch durch weitere Et_2O /EtOH Extraktionen nicht vollständig aus der Wasserphase abtrennen.

In einem Vorversuch wurde eine Probe (4300 dpm) der durch Et_2O /EtOH Extraktion erhaltenen Konjugatphase dünnschichtchromatographisch weiteruntersucht. Folgende Verteilung der Radioaktivität konnte gefunden werden. Die Zuordnung zu unterschiedlichen Substanzgruppen erfolgte über mitchromatographierte Vergleichssubstanzen.

Die Verteilung der Radioaktivität nach Chromatographie einer Teilmenge der Konjugatphase ist in folgender Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1: Verteilung der Radioaktivität nach Chromatographie der Konjugatphase (DC 1; Laufmittel 131)

Fraktion Nr.	Rf-Werte von-bis	Art der Vergleichs- substanzen	Radioaktivi- tätsmenge (dpm)	in%
1	0,00 - 0,15	Start	58	1,35
2	0,15 - 0,31	Zwischenzone	58	1,35
3	0,31 - 0,45	Glucuronide	119	2,7
4	0,45 - 0,58	Steroidsulfate	1181	27,5
5	0,58 - 0,75	Zwischenzone	114	2,6
6	0,75 - 1,00	Freie Steroide	2767	64,5
Insgesamt			4297	100 %

Wie die Tabelle 1 zeigt, gelang es durch die einfache Verteilung zwischen den Phasen bei der vorausgegangenen Extraktion nicht, die Konjugate vollständig von den freien Steroiden abzutrennen.

In gleicher Weise konnten nun die entsprechenden Sulfat- und Glucuronidfraktionen der Hauptmenge der Konjugatphase chromatographisch isoliert werden (DC₂). Dies führte zu einem analogen

Ergebnis, wobei nach Elution der Substanzen aus dem Kieselgel 30.000 dpm (das sind ca. 0,2 % der Gesamtradioaktivität im Perfundat) in der Steroidsulfatfraktion und 3.000 dpm in der Glucuronidfraktion gezählt wurden.

Bei einer Rechromatographie zum Nachweis der Homogenität und Reinheit der Sulfat- und Glucuronidfraktion im gleichen Laufmittel wurden bei der Sulfatfraktion, unter Berücksichtigung der eingetretenen Verluste, die gesamte Menge der Radioaktivität in Zone 4 (Sulfate) wiedergefunden. Dagegen waren nur 30 % der Glucuronidfraktion wieder in Fraktion 3 erfaßbar; die restlichen 70 % ließen sich jetzt im R_f -Wertbereich der Sulfate als Steroidsulfate nachweisen.

Wegen der geringen Substanzmenge in der Steroidglucuronidfraktion wurde diese nicht weiter untersucht.

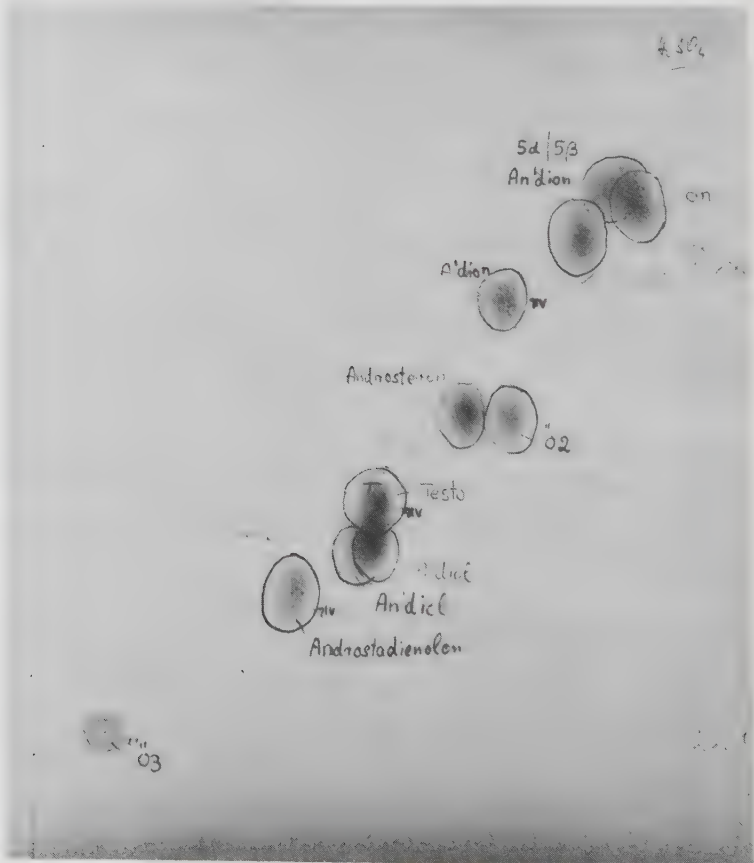
Die Sulfatfraktion wies bei der DC in allen hier verwendeten Laufmitteln gleiche R_f -Wertbereiche wie die authentischen Steroidsulfate (Östron-, Östradiol- und Testosteronsulfat) auf. Die Isolierung einzelner Steroidsulfate erwies sich dünnschichtchromatographisch auf Grund ungenügender Auftrennung als nicht durchführbar. Deshalb wurden mit Hilfe verschiedener, im folgenden Abschnitt beschriebener Methoden die Sulfatgruppen der Steroidsulfate abgespalten. Die so erhaltenen freien Steroide wurden anschließend mit bekannten Verfahren (DC, Derivatbildung) identifiziert:

1. Enzymatische Spaltung

Ein Teil (5000 cpm) der obigen Steroidsulfatfraktion wurde mit einem *Helix pomatia* Extrakt, dem zusätzlich noch Steroid-

sulfatase hinzugefügt worden war, enzymatisch gespalten. Die so erhaltenen freien Steroide konnten in einer 2-dimensionalen DC (Platte 1; Laufmittel 1 und 2) in drei Flecke aufgetrennt werden. Durch Vergleich der Rf-Werte mit denjenigen von authentischen Vergleichssubstanzen, konnten die drei radioaktiven Substanzen als TESTOSTERON, ÖSTRON und ÖSTRADIOL identifiziert werden (Rf-Werte siehe Tabelle III). Ein entsprechendes zweidimensionales Diagramm ist in der folgenden Abbildung zu sehen:

Abb.: 1:



Bei der Messung der quantitativen Zusammensetzung der Sulfatfraktion mit Hilfe eines Dünnschichtscanners ergab sich folgende prozentuale Verteilung der radioaktiven Steroide nach enzymatischer Spaltung und dünnschichtchromatographischer Auftrennung: (siehe auch Scintigramm, Abb.2)

Testosteronsulfat	47,5 %
Östradiolsulfat	30,2 %
Östronsulfat	5,8 %
nicht identifiziert	16,5 %

Beachtenswert ist hierbei der relativ sehr hohe Östrogen-Sulfat-Anteil an der Gesamt-Sulfat-Menge.

2. Saure Hydrolyse

Ein weiterer Anteil der Steroidsulfatfraktion (6.800 dpm) wurde durch saure Hydrolyse gespalten (Wiederauffindung von 77 % in der Toluolphase). Die in der Toluolphase gelösten freien Steroide wurden ebenfalls zwei-dimensional in den Laufmitteln 1 und 2 chromatographiert (DC-Platte 5). Es traten wiederum drei radioaktive Flecke auf. Beim Vergleich ihrer R_f-Werte mit R_f-Werten von authentischen Vergleichssubstanzen konnten die radioaktiven Substanzen der drei Flecke wiederum als TESTOSTERON, ÖSTRON und ÖSTRADIOL identifiziert werden (siehe Tabelle III).

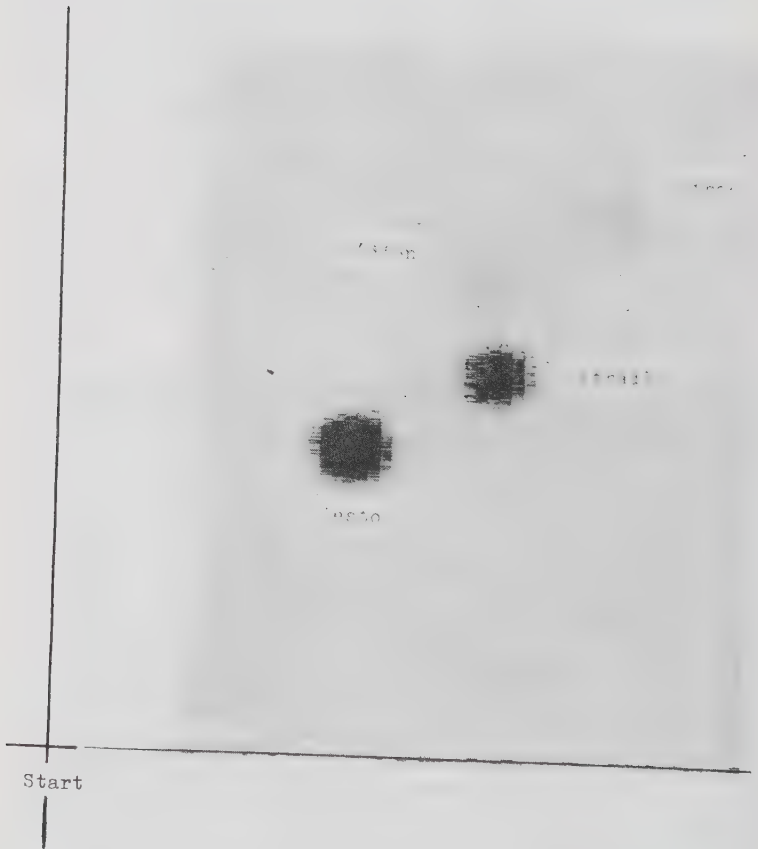


Abb. 2: Diese Abbildung zeigt ein entsprechendes Dünnschicht-Scintigramm nach einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie radioaktiver Steroide.

TABELLE III: Rf-Werte der 2-dimensionalen Chromatographie
in den Systemen 1 (2x) und 2 (3x).

	System 1		System 2	
	Vergleichs- substanz	Radioakti- vität	Vergleichs- substanz	Radioaktivi- tät
Testosteron	0,39	0,39	0,42	0,42
Östron	0,69	-	0,73	-
Östradiol- 17B	0,57	0,52	0,52	0,51
Testosteron	0,42	0,42	0,41	0,41
Östron	0,70	0,75	0,72	0,77
Östradiol- 17B	0,59	0,60	0,51	0,55
Testosteron	0,41	0,41	0,42	0,42
Östron	0,69	0,76	0,73	0,74
Östradiol- 17B	0,57	0,61	0,52	0,53

Vergleich mit Platte Nr. 83

System 1: Benzol/EtOAc 1 : 1

System 2: Chloroform/EtOAc 8 : 2

Dadurch, daß bei der zweidimensionalen DC Vergleichssubstanzen und radioaktive Substanzen nicht gleichzeitig, sondern auf zwei getrennten DC-Platten chromatographiert wurden, lassen sich die geringen Unterschiede

der Rf-Werte in Tabelle III erklären.

TABELLE IV: Rf-Werte der ein-dimensionalen Chromatographie
in den Systemen 3 und 4.

	System 3		System 4	
	Vergleichs- substanz	Radioakti- vität	Vergleichs- substanz	Radioakti- vität
Testosteron	0,22	0,22	0,25	0,25
Östron	0,51	0,22	0,47	0,47
Östradiol- 17β	0,37	0,37	0,47	0,47
Testosteron- Acetat	0,45	0,45	0,55	0,55
Östron- Acetat	0,53	-	0,52	0,52
Östradiol- 17β-Acetat	0,62	0,62	0,73	0,73

System 3: Cyclohexan/EtOAc 50 : 50

System 4: Chloroform/Aceton 95 : 5

4. DISKUSSION

Bereits 1962 konnte BAULIEU (6) in der Nebennierenrinde und damit erstmals in einem endokrinen Organ, die Bildung von Steroidsulfaten nachweisen. Er widerlegte dadurch die vormals bestehende Vorstellung, daß nur die Leber in der Lage sei, Steroide und andere endogene und exogene Substanzen zu sulfatieren, was ihrer Löslichkeitserhöhung und der besseren Ausscheidung über die Niere dienen sollte.

Nachdem von LAATIKAINEN et al. 1969 und 1971 (28,29) und von RUOKONEN et al. 1972 (49) und anderen Autoren (38,42,34) eine hohe Steroidsulfatsekretion in tierischen und menschlichen Testes nachgewiesen worden ist, stellt sich die Frage, ob auch das Ovar in der Lage ist, Steroidkonjugate und speziell Steroidsulfate zu bilden und zu sezernieren. In der Literatur findet man zu dieser Fragestellung unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Angaben.

WALLACE und SILBERMAN (62), denen es schon 1964 gelungen war, den Nachweis der Sulfatierung von Androstenolon und ⁵-Androsten-3, 17 β -diol in normalen, menschlichen Ovarien zu erbringen, arbeiteten mit Ovarhomogenaten. Die mit dieser Methode erhobenen Befunde sagen allerdings wenig über die Verhältnisse im intakten Ovar aus.

Während AAKVAAG und FYLLING 1968 (2) die Bildung von Steroidsulfaten in drei menschlichen Ovarien (Stein-Leventhal, Endometriose, FSH-stimuliert) beschrieben haben, meinten KALLIALA et al. (25) 1970 eine Sekretion von Steroidsulfaten des normalen, menschlichen Ovars ausschließen zu können, da die Steroidkonzentrationen im peripheren Blut und im Ovarialvenenblut nicht unterschiedlich gefunden wurden.

Das für unsere Untersuchungen verwendete Material wurde aus in vitro perfundierten, menschlichen Ovarien gewonnen. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß unter den angewandten Versuchsbedingungen das Ovar in einem weitgehend physiologischen Zustand verbleibt, was durch die fortlaufenden Kontrollen des arteriellen Druckes und die Messungen des Sauerstoff- und Glucoseverbrauches während der Perfusion belegt wird (54). Ein Zelluntergang und damit die Freisetzung mitochondrialer oder zytoplasmatischer Enzyme, die in den Steroidstoffwechsel eingreifen können, wurde durch Enzymaktivitätsmessungen im Ovarperfusat ausgeschlossen.

Auch eine Beeinflussung des Steroidsulfatstoffwechsels durch andere Organe ist bei dieser Methodik nicht möglich.

Die hier vorliegende Arbeit weist die Bildung der Steroidkonjugate Testosteronsulfat, Östradiolsulfat und Östronsulfat im in vitro perfundierten Ovar mit den oben beschriebenen Methoden eindeutig nach. Der Beweis wurde hier indirekt geführt, indem gezeigt wurde:

1. Daß Metabolite des angebotenen 4-¹⁴C-Testosterons gebildet werden, die sich in der Dünnschichtchromatographie wie Steroidkonjugate verhalten.
2. daß diese polaren Metabolite durch spezifische Spaltung mit Steroidsulfatase in freie Steroide überführt werden können,
3. daß auch die saure Hydrolyse, die bekanntlich zur Spaltung von Sulfatestern eingesetzt wird, zur Bildung der gleichen freien Steroide führt,

4. daß die freigesetzten Steroide selbst und ihre Derivate mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie durch Vergleich mit authentischen Substanzen eindeutig indentifizierbar sind.

Der direkte Beweis, daß es sich bei den isolierten Substanzen um Steroidsulfate handelt, wurde in parallel laufenden Versuchen von STURM (55) am Beispiel des mengenmäßig am meisten vorhandenen Testosteronsulfates mit dem Verfahren der Kokristallisation mit authentischen Vergleichssubstanzen zur konstanten spezifischen Aktivität erbracht.

Im von uns untersuchten Fall lagen nur knapp 0,2 % der ursprünglich im Perfundat enthaltenen Gesamtradioaktivität als Steroidsulfate vor. Andere Autoren, wie zum Beispiel WORTMANN et al. (66a) 1974, konnten eine Steroidsulfatierung in Ovarien von Rhesusaffen von 2,7 % nachweisen, wobei sie allerdings zum Anbieten der Precursoren die Ultraschallphonophorese verwandten und der Sulfatnachweis analytisch nicht zweifelsfrei erbracht wurde.

Betrachtet man die Gruppe der freien Steroide im Einzelperfundat für sich, so findet man im vorliegenden Beispiel für Testosteron, Östradiol und Östron Anteile von 94,3 %, 1,8 % und 0,2 %.

Dagegen finden sich in der Steroidsulfatgruppe mit prozentualen Anteilen für Östradiolsulfat und Östronsulfat von 30,2 % bzw. 5,8 % die Östrogensulfate stark angereichert. Der Grund dafür kann einmal darin gesehen werden, daß durch die zirkulierende Perfusion bedingt Endprodukte, z.B. Östrogene, im Perfundat angereichert und anschließend sulfatiert werden. Zum anderen

aber kann dieses Ergebnis Rückschlüsse auf eine spezifische Sulfatierung von Steroiden im Ovar erlauben, zumal von STURM et al. 1974 (55,56) gezeigt werden konnte, daß die Bildung von Östrogensulfaten im Verhältnis zu Testosteronsulfat durch Stimulation mit Gonadotropinen signifikant erhöht werden kann, während die Gesamtmenge der gebildeten Steroidsulfate sogar leicht abnimmt.

Über den genauen Weg, auf dem die Östrogensulfate bei 4-¹⁴C-Testosteron als Precursor im Ovar gebildet werden, ob durch direkte Aromatisierung von vorher synthetisiertem Testosteronsulfat - analog zu bereits nachgewiesenen Stoffwechselwegen anderer Steroidsulfate (8,47,15,31,10) - oder durch vorangehende Aromatisierung von Testosteron zu Östrogenen und anschließender Sulfatierung dieser Östrogene, kann hier nichts Näheres ausgesagt werden.

Die vermutete Bildung von Steroidglucuroniden im perfundierten Ovar konnte durch DC der Konjugate mit authentischen Vergleichssubstanzen wahrscheinlich gemacht werden. Die hier gefundenen Substanzmengen reichten jedoch nicht aus, um eine weitere Identifizierung vorzunehmen.

Für Funktion und Bedeutung der bisher nachgewiesenen Steroidsulfate lassen sich noch keine ausreichenden Erklärungen finden. Die Tatsache, daß viele dieser Substanzen lange Halbwertszeiten haben und im Vergleich zu freien Steroiden in hohen Konzentrationen im Blut vorkommen, läßt vermuten, daß Steroidsulfate als Reservoirs für die schnelle Freisetzung biologisch aktiver Steroide dienen können (64,63,57). Funktionen als Zwischenprodukte mit regulativer Schlüsselstellung im Steroidstoffwechsel (47,7,14,33,43), als Neben- und Umgehungswege der normalen Steroidsynthese - zum Teil

ohne vorherige Abspaltung der Sulfatgruppe - können diskutiert werden (vgl. 27,39,8,47,15).

Mit dem in der vorliegenden Arbeit geführten Nachweis der Bildung von Steroidsulfaten im menschlichen Ovar selbst kann zu diesem Problem der möglichen biologischen Funktion dieser Stoffe nichts ausgesagt werden. Dies bleibt vielmehr zukünftigen Untersuchungen vorbehalten, wobei jedoch noch weitere, offengebliebene Fragen, z.B. nach der genauen Stellung der Sulfatgruppen bei Steroiden mit mehreren Hydroxylgruppen bzw. nach der Bildung von Disulfaten zu beantworten sind. Die Messung der Sulfatierungsvorgänge unter verschiedenen Funktionszuständen der Ovarien könnte klären, ob den Steroidsulfaten physiologischerweise Bedeutung für regulative Vorgänge im Zyklus zukommt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die vermutete Bildung und Sekretion von Steroidkonjugaten durch das menschliche Ovar untersucht. Die im Perfundat eines Ovars nachweisbaren stark polaren Metabolite des als Precursor angegebenen 4-¹⁴C-Testosteron ließen sich mit einem Äther-Alkohol-Gemisch aus dem Perfusionsmedium extrahieren. Zum Nachweis, zur Isolierung und Identifizierung dieser Metabolite fanden folgende Methoden Verwendung:

1. Dünnschichtchromatographie (DC) der Konjugate; Identifizierung durch Vergleich der R_f-Werte mit denjenigen authentischer Steroidsulfate und -Glucuronide.

2. a) Enzymatische Spaltung der Konjugate durch Steroidsulfatasen,

- b) Saure Hydrolyse der Konjugate.

Vergleichende Dünnschichtchromatographie der durch enzymatische Spaltung oder durch saure Hydrolyse der Konjugate gebildeten freien Steroide; Identifizierung durch Derivatbildung und Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Laufmitteln.

Mit diesen Verfahren gelang es, im Ovarperfundat die Sulfate von Testosteron, Östradiol und Östron zu identifizieren und damit ihre Bildung und Sekretion im Ovar nachzuweisen. Die Sulfatierungsrate des menschlichen Ovars wurde in der vorliegenden Untersuchung mit ca. 0,2 % der Gesamtradioaktivität

sehr niedrig gefunden. Innerhalb der Gruppe der Steroid-sulfate konnte allerdings mit 36 % - freie Steroide 2,0 % - ein auffallend hoher Anteil der Östrogensulfate nachgewiesen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. AAKVAAG, A. and EIK-NES, K.B. Metabolism in vivo of steroids in the canine ovary
(1965) Biochim.biophys.Acta (Amst.) 111, 273.
2. AAKVAAG, A. and FYLLING, P. Method for the simultaneous determination of Progesterone, Androstenedione, Testosterone and Dehydroepiandrosterone sulfate in biological fluids.
(1968) Acta Endocr. (Kobenhavn) 57, 447.
3. ADAMS, J.B. Formation of steroid sulphates by extracts of adrenals.
(1963) Biochim.biophys.Acta.(Amst.) 71, 243-5.
4. ADAMS, J.B. I. Sulphation of steroids by human adrenal extracts.
(1964) Biochim.biophys.Acta.(Amst.) 82, 572-80.
5. ADAMS, J.B. (1964) J.Clin.Endocr. 24, 988
6. BAULIEU, E.E. Studies of conjugated 17-Ketosteroids in a case of adrenal tumour.
(1962) J.Clin.Endocrinol.and Metabolism, 22, 501.

7. BAULIEU, E.E., CORPÉCHOT, C., and EMILIOZZI, R.:
H³-Androstene -3 β , 17 β -Diol-S³⁵-3-Sulfate to H³-Dehydroisoandrosterone-S³⁵-Sulfate in vivo: An example of the 'Direct' Metabolism of a steroid conjugate.
(1963) Steroids, 2, 429.
8. BAULIEU, E.E., CORPÉCHOT, C., DRAY, F., EMILIOZZI, R., LEBEAU, M.C., MAUVAIS-JARVIS, P. and ROBEL, P.:
An adrenal-secreted androgen: Dehydroisoandrosterone sulfate. Its metabolism and a tentative generalisation on the metabolism of other steroid conjugates in man.
(1965) Recent Progr. of Hormone Research 21, 411-94.
9. BEGUE, J.A.:
Identification du sulfate de prég-nénolone dans le plasma humain normal.
(1965) C.R. Acad.Sci. (Paris) 260, 3777-9.
10. BOLTÉ, E., MANCUSO, S., ERIKSSON, G., WIKVIST, N. and DICZFALUSY, E.:
Aromatisation of C-19-steroids by placentas perfused in situ.
(1964) Acta endocr. (Kbh.) 45, 535-99.
11. BORSTRÖM, H., FRANKSSON, C. and WENGLE, B.:
Studies on esters of sulphates.
22. Sulphate conjugation in adult human adrenal extracts.
(1964) Acta.endocr. (Kbh.) 47, 633-44.

12. BORSTRÖM, H. and WEINGLE, B. (1967) Acta Endocr. (Kobenhavn) 56, 691.
13. BUTENANDT, A. and HOFSTETTER, H.: Estrone sulfate, a physiological excretory product from follicular hormone. (1939) Z.physiol. Chem. 259, 222-34.
14. CALVIN, H.I., VANDE WIELE, R.L. and LIEBERMAN, S.: In vivo conversion of Pregnenolone-Sulfate-S³⁵ to Dehydroisoandrosterone Sulfate S³⁵ (1963) Biochemistry, 2, 648.
15. CALVIN, H.I. and LIEBERMAN, S.: Studies on the Metabolism of pregnenolone sulfate. (1966) J.clin.Endocr.Metabolism 26, 402-24.
16. COHN, G.L., MULROW, P.J. and DUNN, V.C.: In vitro synthesis of dehydroepiandrosterone sulfate by an adrenal adenoma. (1963) J.Clin.Endocrinol. and Metabolism 23, 671.
17. DE BOER und BACKER: (1956) Org.Synth. 36, 16
18. DIXON, R., VINCENT, V. and KASE, N.: Biosynthesis of steroid sulfates by normal human testis. (1965) Steroids 6, 757-69.

19. DULLEFELD, von E. and BREUER, H.: Vorkommen, Biogenese und Stoffwechsel von Steroidsulfaten. (1966) Zeitschr. für Vitamin-, Hormon- und Fermentforschung, 14, 193-298.
20. DRAYER, M.N., ROBERTS, K.D., BANDI, L. and LIEBERMAN, S.: The isolation of cholesterol sulfate from bovine adrenals. (1964) J.Biol.Chem. 239, Pc 3112-4.
21. EBERLEIN, W.R.: Steroids and sterols in umbilical cord blood. (1965) J.clin.Endocr.Metab. 25, 1101-18.
22. ENGELS, T.A., FRIEDLANDER, R.L. and EIK-NES, K.B.: (1968) Metabolism 17, 189.
23. GUAL, C., ROJO, B., LEMUS, A.E. and RIVERA, R.: (1962) Sociedad Mexicana de Nutricion y Endrocrinologica, 3 rd Meeting, p. 126.
24. HOLCENBERG, J.S. and ROSEN, S.W.: Enzymatic Sulfation of Steroids by Bovine Tissues. (1965) Arch.Biochem. 110, 551-7.
25. KALLIALA, K., LAATIKAINEN, T., LUUKKAINEN, T. and VIHKO, R.: Neutral Steroid Sulfates in Human Ovarian Vein Blood. (1970) J.Clin.Endocrinology and Metabolism, Vol. 30, N.4, 533-535.

26. KLEIN, G.P. and GIROUD, C.J.P.: Sulfation of corticosteroids by the adrenal of human newborn. (1965) Steroids 5, 765-72.
27. KNAPSTEIN, P., WENDELBERGER, F. and OERTEL, W.G.: Direct Metabolism of 7α - ^3H -Dehydroepiandrosteron- ^{35}S -sulphate in human ovarian tissue. (1967) Experienta 23: 851-2.
28. LAATIKAINEN, T. and VIHKO, R.: (1969) Eur.J.Biochem. 10, 165.
29. LAATIKAINEN, T. LAITINEN, E.A. and VIHKO, R.: Secretion of Free and Sulfate-Conjugated Neutral Steroids by Human Testis. Effect of Administration of HCG. (1971) J.Clin.Endocrinol.Metab. 32, 5.
30. LEBEAU, M.C. and BAULIEU, E.E.: In vitro biosynthesis of corticosteroid sulfates by adrenal tumoral tissue. (1963) Endocrinology 73, 832-4.
31. LEBEAU, M.C., ALBERGA, A. and BAULIEU, E.E.: Adrenal biosynthesis of dehydroisoandrosterone sulfate. (1964) Biochem.biophys.Res.Commun. 17, 570-2.
32. LISBOA, B.P. and DICZFALUSY, E.: Colour Reactions for the in situ characterisation of steroid oestrogen on Thin-layer chromatograms. (1963) Acta Endocrin., 43, 545.

33. MASON, M., and GULLEKSON, E.: Inhibition and Protection of Kynurenine Transaminase by the Sulfate Esters of Diethylstilbestrol, Estradiol and Estrone. (1960) Biol.Chem. 235, 1312.
34. MATHUR, R.S., WIKVIST, N. and DICZFALUSY, E.: De novo synthesis of steroids and steroid sulphates by the testicles of human foetus at midgestation. (1972) Acta. Endocr. 71, 792-800.
35. MELVILLE, E. and BRAUNSBURG, H.: Steroid Sulphation by Human Female Reproductive Tissues in vitro. (1973) Biochemical Society Transactions, 1, 757.
36. MOSER, H.W., MOSER, A.B. and ORR, J.C.: Preliminary observations on the occurrence of cholesterol sulfate in man. (1966) Biochim.biophys.Acta. (Amst) 116, 146-55.
37. NAKAYAMA, T., ARAI, A., NAGATAMI, K., SATOH, K., TABEI, T., YANAIHARA, T., and FUJITA, Y.: (1967) Endocr. Jap. 14, 259.
38. NOTATION, A.D. and UNGAR, F.: Regulatory interactions of dehydro-epiandrosterone and its sulfate in rat testis tissue. (1968) Can.J.Biochem. 46, 1185-90.

39. OERTEL, W.G., TREIBER, L., WENZEL, D., KNAPSTEIN, P. WENDELBERGER, F. and MENZEL, P.: In vivo perfusion of the Human Ovary with 4-¹⁴C-Dehydroepiandrosterone and 7 α -³-Dehydroepiandrosterone ³⁵-Sulfate. Biosynthesis of Steroid Hormones in Human Gonads, V. (1968) *Experientia* 24, 607-9.
40. PASQUALINI, J.R., DUTTER, F. and JAYLE, M.F.: Mode de conjugation du pregna-5-ene-3 β , 21-diol-20-one et du pregna-5-ene 3 β 17 α , 21-triol-20-one chez l'homme. (1963) *Biochim.biophys. Acta.* (Amst.) 69, 331-6.
41. PAYNE, A.H. and MASON, M.: Sulfurylation of Estradiol-17 β by Extracts of Ovary, Corpus Luteum, Testis and Adrenal Cortex. (1965) *Steroids* 5, 21-36.
42. PAYNE, A.H. and MASON, M.: Conversion of dehydroepiandrosterone sulfate to androst-5-ene diol-3-sulfate by soluble extracts of rat testis. (1965) *Steroids* 6, 323.
43. PAYNE, A.H., ANITA, H. and ROBERT, B. JAFFE: Androgen Formation from Pregnenolone Sulfates by the Human Fetal Ovary (1974) *J.clin.Endocr. Metab.* 39, 300-304.

44. PURDY, R.H., ENGEL, L.L.
and ONCLEY, J.L.: The characterization of estrone
sulphate from human plasma.
(1961) J.biol.Chem. 236, 1043-50.
45. RADO, A., JOHN, A.
Mc CRACKEN and D.T. BAIRD: The Formation of Oestrogens by the
Autotransplanted Ovary of the Ewe
Perfused in Vivo with C₁₉-Steroids.
(1970) Acta Endocrinologica 65,
244-260.
46. ROBBINS, P.W. and
LIPMANN, F.: Separation of two Enzymatic Phases
in Active Sulfate Synthesis.
(1958) J.biol.Chem. 233, 681-5.
Enzymatic Synthesis of Adenosin-5'-
Phosphosulfate.
J.biol.Chem. 233, 686-90.
47. ROBERTS, K.D., BANDI, L,
CALVIN, H.I., DRUCKER, W.D.
and LIEBERMAN, S.: Evidence that steroid sulfates serve
as biosynthetic intermediates.
(1964a) Biochemistry 3, 1983-8.
(1964b) J.Amer.chem.Soc. 86, 958-9.
48. ROY, A.B.: The Synthesis and Hydrolysis of
Sulfate Esters.
(1960) Advanc.Enzymolog., 22, 205-35.
49. RUOKONEN, A., LAATIKAINEN,
T., LAITINEN, E.A. and
VIHKO, R.: Free and Sulfate-Conjugated Neutral
Steroids in Human Testis Tissue.
(1972) Biochemistry, Vol. 11,
No. 8, 1411.

50. SANDBERG, E.C., JENKINS, R.C.: Aryl and Steroid sulfatase in human ovary.
(1966) Biochim.biophys.Acta. 113, 190-93.
51. SCHACHTER, B. and MARRIAN, G.F.: The Isolation of Estron Sulfate from the Urin of Pregnant Mares.
(1938) J.biol.Chem., 126, 663-9.
52. SIMMER, H.H., DIGMAN, W.J., EASTERLING, W.E., Jr., FRANKLAND, M.W. and NAFTOLIN, F.: Neutral C₁₉-Steroids and steroid sulfates in human pregnancy.
(1966) Steroids, 8, 179-93.
53. SNEDDON, A. and MARRIAN, G.F.: Sulphation of oestrone in vitro by bovine adrenal tissue.
(1963) Biochem. J. 86, 385-8.
54. STÄHLER, E., HUCH, A.: Untersuchungen am isoliert perfundierten Ovar des Rindes.
(1971) Arch.Gynäk. 211, 527.
55. STURM, G. et al.: Steroid metabolism and conjugation in the human ovary perfused in vitro.
(1974) J.Steroid Biochem. 5, no 71, 313.
56. STURM, G., STÄHLER, E. und DAUME, E.: Steroid sulfatation in human ovaries with Graafian Follicles during in vitro perfusion.
(1975) Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 193, 104.

57. TAIT, J.F. and BURSTEIN, S.: In vivo studies of steroid dynamics IN MAN. In: Hormones 5, 441-557. (1964)
Ed.G.Pincus, K.V.Thimanmand
E.B. Astwood.
Academic Press Inc.
58. TOUCHSTONE, J.C. and MURAWEC, T.: Free and conjugated estrogens in blood plasma during human pregnancy. (1965) Biochemistry 4, 1612-14.
59. VENNING, E.H., HOFFMANN, M.M. and BROWNE, J.S.L.: Isolation of androsterone sulfate. (1942) J.biol.Chem. 146, 369-79.
60. VIHKO, R.: Gas chromatographic-mass spectrometric studies on solvolizable steroids in human peripheral plasma. (1966) Acta.endocr. (Kbh.) 49, 427-35.
61. WALLACE, E. and LIEBERMAN, S.: Biosynthesis of dehydroisoandrosterone sulfate by human adrenocortical tissue. (1963) J.Clin.Endocrinol. and Metabolism, 23, 90.
62. WALLACE, E. and SILBERMAN, N.: Biosynthesis of Steroid Sulfates by Human Ovarian Tissue. (1964) J.biol. Chem., 239, 2809-12.

63. WANG, D.Y. and BULBROOK, R.D.: Binding of the sulphate esters of dehydroepiandrosterone, testosterone, 17-acetoxypregnenolone and their sulphate esters in man or in rabbit. (1967) J.Endocrin. 39, 405-13.
64. WANG, D.Y. and BULBROOK, R.D.: Steroid sulphates. (1968) In: Advanced in Reproductive Physiology, Vol. 3, 113-146.
65. WIELAND, R.G., LEVY, R.P., KATZ, D. and HIRSCHMANN, H.: Evidence for secretion of 3β -hydroxy-androst-5-en-17-one sulfate by measurement in normal human adrenal venous blood. (1963) Biochim.Biophys. Acta.(Amst.) 78, 566-8.
- 66a. WILSON, L.G. and BANDURSKI, R.S.: Enzymatic Reactions involving Sulfate Sulfite, Selenate and Molybdate, J.biol.Chem., 233, 975-81.
- 66b. WORTMANN, W., WORTMANN, B., SCHENKER, J. and TOUCHSTONE, J.C.: Perfusion of the Rhesus monkey ovary with 2,4,6,7 - ^3H -estrone in vivo. (1974) J.Steroid Biochemistry 5, No. 4, 321.
67. YOUNG, L. and MAW, G.A.: (1958) In: The Metabolism of Sulphur Compounds, Methmen & Co., Ltd., London

7. LEBENSLAUF

Am 11. März 1951 wurde ich als erster Sohn des Schlossers Josef Grosch und seiner Ehefrau Hildegard, geborene Wehner, in Petersberg, Kreis Fulda, geboren, wo ich mit zwei jüngeren Geschwistern aufwuchs. Ab 1957 besuchte ich vier Jahre lang die Volksschule in Petersberg, danach neun Jahre die Rabanus-Maurus-Schule in Fulda (humanistisches Gymnasium), die ich am 6. Juni 1969 mit dem Abitur abschloß. Am 13. Oktober 1969 immatrikulierte ich mich an der Philipps-Universität in Marburg für Humanmedizin. Am 3. Oktober 1970 bestand ich hier die naturwissenschaftliche Vorprüfung. Die ärztliche Vorprüfung legte ich am 28. März 1972 ebenfalls in Marburg ab. In der Zeit meines klinischen Studiums war ich fünf Semester lang als Tutor für Anatomie angestellt. Zu Famulaturen war ich im Rudolf-Virchow-Krankenhaus in Berlin, in der Universitäts-Frauenklinik in Marburg und im Sapporo Medical College in Sapporo/Japan. Nach elf Semestern schloß ich in Marburg das Studium der Medizin im Sommer 1975 mit dem Staatsexamen ab.

8. AKADEMISCHE LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

Amon, Aurich, Aziz, Bommer, Braasch, Buchholz, Castenholz,
Daume, Dehnicke, Dimroth, Dittrich, Dölle, Dombrowski,
Eschenbach, Exner, Friederich, Fruhstorfer, Gallwitz, Ganz,
Golenhofen, Grundner, Haberich, Hamelmann, Hardewig,
Havemann, Hensel, Heuser, Heß, Hildebrandt, Hilgermann, Hort,
Ihm, Jacob, Kaffarnik, Karlson, Klaus, Klein, Kleinsasser,
Koransky, Lange, Linneweh, Lütcke, Mann, Mannheim, Maroske,
Martini, Niemeyer, Petry, Portig, Pots, Reim, Remschmidt,
Rodeck, Rohen, Schachtschabel, Schaumlöffel, Schiff, Schleyer,
Schmid, Schmitz-Moormann, Schneider, Seidel, Seifart, Sekeris,
Siegert, Straub, Sturm, Thoenes, Uhlarik, Walcher, Wendt,
Welge-Lüßen, Wesemann, Wiegandt, Willenbockel.

Danksagung:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Universitäts-Frauenklinik Marburg, Direktor Prof.Dr.med. R. Buchholz, angefertigt, dem ich für den Arbeitsplatz zu Dank verpflichtet bin.

Herrn Prof.Dr.rer.nat. G. Sturm danke ich für die Überlassung des Themas, für die Ratschläge und Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung meiner Arbeit und für die Übernahme des Referates.

Ebenso danke ich allen anderen, die mir bei der Durchführung der Chromatographie behilflich waren, insbesondere Frau Juraschek, Frl. Schäfer und Frau Schüler.

Die Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg. (Bu 153/17-252)

